

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-292485

(43)公開日 平成6年(1994)10月21日

(51)Int.Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

A 0 1 K 67/027

9123-2B

審査請求 未請求 請求項の数6 O L (全 5 頁)

(21)出願番号 特願平5-79221

(22)出願日 平成5年(1993)4月6日

(71)出願人 593066999

宮崎 純一

東京都文京区本郷6丁目13番1号

(71)出願人 593067000

岡 芳知

東京都世田谷区代沢1丁目13番9号

(72)発明者 宮崎 純一

東京都文京区本郷6丁目13番1号

(72)発明者 岡 芳知

東京都世田谷区代沢1丁目13番9号

(74)代理人 弁理士 大多和 明敏 (外1名)

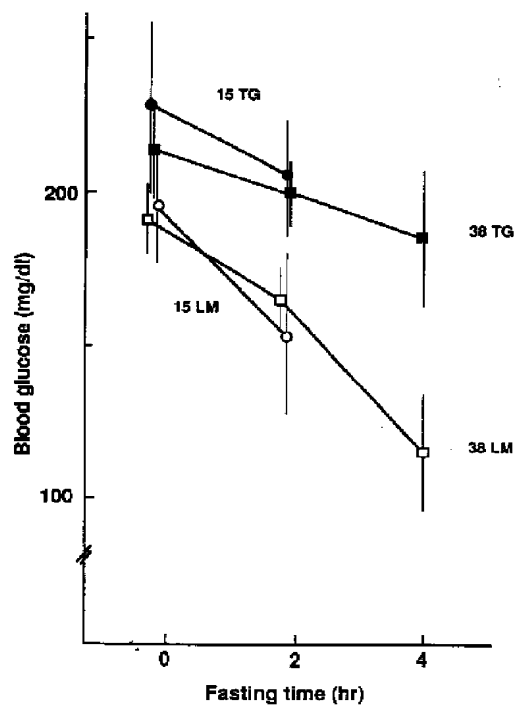
(54)【発明の名称】 遺伝子導入糖尿病モデル動物

(57)【要約】

【目的】 遺伝的に高血糖あるいは糖尿病を呈する疾患モデル動物を提供する。

【構成】 アンチセンス・グルコキナーゼ遺伝子を染色体に安定に取り込んだ糖尿病モデルマウス。

【効果】 血糖値維持機構の解析や抗糖尿病薬の開発に有用である。



【特許請求の範囲】

【請求項1】血糖上昇に関与する遺伝子を、分化全能性を有する細胞内に導入してなる遺伝子導入哺乳動物。

【請求項2】血糖上昇に関与する遺伝子が、グルコキナーゼ活性を抑制する遺伝子である請求項1記載の遺伝子導入哺乳動物。

【請求項3】グルコキナーゼが膵β細胞に特異的なものである、請求項2記載の遺伝子導入哺乳動物。

【請求項4】遺伝子がアンチセンス・グルコキナーゼ遺伝子である請求項2または3記載の遺伝子導入哺乳動物。

【請求項5】アンチセンス・グルコキナーゼ遺伝子が、内在性グルコキナーゼ遺伝子の発現している組織または細胞で働くプロモーターまたはエンハンサー／プロモーターを有している請求項4記載の遺伝子導入哺乳動物。

【請求項6】膵β細胞で働くプロモーターまたはエンハンサー／プロモーターを有している請求項5記載の遺伝子導入哺乳動物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】この発明は、糖尿病の遺伝形質を有するヒト疾患モデル動物に関するものである。さらに詳しくは、この発明は、血糖上昇に関与する遺伝子、例えばアンチセンス・グルコキナーゼ遺伝子を哺乳動物の分化全能性を有する細胞内、例えば受精卵に導入してなる、糖尿病発症機構の研究、糖尿病の治療法、治療薬の開発に有用な、ヒト疾患モデル動物に関するものである。

【0002】

【従来の技術および発明が解決すべき課題】ヒト疾患の原因解明、診断ならびに予防、治療技術の開発にあたっては、実験動物を用いた実験系が重要な役割を果たしている。このため、ヒト疾患に類似した特定の異常を先天的、遺伝的に有し、高率でその症状を発生する疾患モデル動物の開発が医学研究分野における重要課題となっている。従来、このような疾患モデル動物は、飼育中に偶然に得られるか、人工的に突然変異を誘発することにより得られるかしたものである。しかしながら、このような方法では、望ましい形質をもつ疾患モデル動物は非常に低い確率でしか得ることはできない。一方、近年の分子生物学、遺伝子工学技術の発達により、人為的に生物の遺伝子の発現を制御することが可能になってきた。今日では高等生物に対しても、形質の改変が可能になってきている。たとえば、外来性遺伝子DNAを染色体の一部に安定に組み込んだ遺伝子導入（トランスジェニック）動物がガードンらにより報告（プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Proc. Natl. Acad. Sci. USA）77巻、7380頁、1980年）されて以来、種々の遺伝子導入動物が報告されている。これらの遺伝子導入動物は、動物の全能性細胞（受精卵、初期

胚、胚幹細胞）に外来遺伝子DNAを導入し、それを仮親の卵管または子宮に戻し、発生を継続させることにより産出されたものである。このようにして得られた遺伝子導入動物は、外来遺伝子を子孫にも伝達するので、形質改良動物としても有用である。この場合、外来遺伝子は付加的に発現することになるが、外来遺伝子が内在性遺伝子の作るRNAに相補的なアンチセンスRNAを発現するようにさせることにより、内在性遺伝子の働きを抑制することも可能である〔Katsuki et al., サイエンス（Science）241巻、593頁、1988年〕。

【0003】今日、食生活や生活環境の変化に伴い、日本においても糖尿病患者は増加傾向にあり、糖尿病の病態の解明、治療法の改良は医学において更に重要なテーマとなってきた。糖尿病は、インスリン依存型（IDDM, I型）とインスリン非依存型（NIDDM, II型）に分けられる。IDDMは、ウィルス感染などが引き金となって膵β細胞が自己免疫反応によって破壊されることにより発症する。しかし、糖尿病の大多数を占めるものはNIDDMで、末梢におけるインスリン抵抗性とβ細胞からのインスリン分泌不全がその発症に関与すると考えられている。膵島β細胞は、血糖調節において、唯一の血糖低下ホルモンであるインスリンを分泌するが、その生理機能がいかなる環境のもとに支配・調節されているのか、まだ十分解明されていない。そこで血糖を上昇させる因子をコードする遺伝子を組み込んだ遺伝子導入動物が、糖尿病の遺伝形質を有するヒト疾患モデル動物として有用であると考えられる。この血糖を上昇させる因子としては、インスリン分泌を抑制するソマトスタチン、ガラニン、インターロイキン-1（IL-1）などのペプチドホルモンやサイトカインをコードする遺伝子が挙げられる。また膵β細胞内でインスリン分泌刺激シグナルの伝達に関与する蛋白性因子をコードする遺伝子の活性を抑制するアンチセンス遺伝子なども挙げられる。さらに、インスリン作用を抑制するアンチセンス・インスリンレセプター遺伝子や、異常インスリンレセプターをコードする遺伝子なども挙げられる。

【0004】この血糖値の調節因子については、種々研究がなされているが、最近、膵島β細胞に特異的なグルコキナーゼが発現しており、それが血糖値の感知に重要な役割を果たしていることが示唆されている。したがって、β細胞のグルコキナーゼの発現制御は生体の恒常性維持に重要であるだけでなく、II型糖尿病の成因とも深く関係していると考えられている。実際、若年発症インスリン非依存型糖尿病（MODY）の家系で、発症とグルコキナーゼ遺伝子に見出される変異が相関することが示された。さらに本発明者らは、日本人の成人発症インスリン非依存型糖尿病の多発家系にグルコキナーゼ遺伝子変異を見出した〔ランセット（Lancet）340巻、1316頁、1992年〕。報告されている患者はすべて、遺伝子の片方に変異をもつヘテロの状態であることから、グルコ

キナーゼの活性が膵β細胞で半減することにより、血糖が上昇することを示唆している。さらに重要なことは、グルコキナーゼ遺伝子異常の患者では、糖負荷試験でのインスリン初期分泌反応が障害を受けていることであり、このインスリン初期分泌反応の低下は日本のインスリン非依存型糖尿病患者のほぼすべてに見出される。

【0005】

【課題を解決するための手段】上記の糖尿病に関するこれまでの研究の結果、動物においてグルコキナーゼの活性が低下することにより、日本のインスリン非依存型糖尿病患者の大多数と同様のインスリン分泌障害をきたすと考えられる。しかしながら、これまでグルコキナーゼ活性の低下を示した実験動物モデルは得られておらず、グルコキナーゼ活性と糖尿病発症の関係は明らかではなかった。そこで、本発明者らは血糖上昇に関与する遺伝子を導入することにより、例えば膵β細胞におけるグルコキナーゼ活性を特異的に抑制する遺伝子を導入することにより、糖尿病発症モデル動物、例えばマウスを作製することを考え、そのために、グルコキナーゼのアンチセンスRNAを膵β細胞で発現する遺伝子導入動物を作製することによってその目的を達成したものである。すなわち本発明は（1）遺伝子産物（RNAを含む）が血糖上昇に関与する遺伝子を、分化全能性を有する細胞内に導入してなる遺伝子導入哺乳動物、（2）血糖上昇に関与する遺伝子が、グルコキナーゼ活性を抑制する遺伝子である上記（1）記載の遺伝子導入哺乳動物、（3）グルコキナーゼが膵β細胞に特異的なものである、上記（2）記載の遺伝子導入哺乳動物、（4）グルコキナーゼを抑制する遺伝子がアンチセンス・グルコキナーゼ遺伝子である上記（2）または（3）記載の遺伝子導入哺乳動物、（5）アンチセンス・グルコキナーゼ遺伝子が、内在性グルコキナーゼ遺伝子の発現している組織または細胞で特異的にあるいは非特異的に働くプロモーターまたはエンハンサー／プロモーターを有している上記（4）記載の遺伝子導入哺乳動物、および（6）膵β細胞で特異的にあるいは非特異的に働くプロモーターまたはエンハンサー／プロモーターを有している遺伝子がアンチセンス・グルコキナーゼ遺伝子である上記（5）記載の遺伝子導入哺乳動物に関するものである。

【0006】ここで分化全能性を有する細胞とは、どのような組織にも分化し得る能力を有する細胞のことで、これらの具体例としては前述のように受精卵、初期胚、胚幹細胞等が挙げられる。血糖上昇に関与する遺伝子としては、血糖値を上昇させる因子をコードする遺伝子の他、血糖値を下げる因子の活性を低下させる遺伝子を挙げることができ、血糖値を下げる因子としては先に挙げた膵島β細胞に特異的なグルコキナーゼ等が挙げられる。このグルコキナーゼ活性を抑制する遺伝子として、アンチセンス・グルコキナーゼ遺伝子が挙げられる。その他、血糖上昇に関与する遺伝子としては、インスリン

分泌を抑制するソマトスタチン、ガラニン、インターロイキン-1（IL-1）などのペプチドホルモンやサイトカインをコードする遺伝子が挙げられる。また膵β細胞内でインスリン分泌刺激シグナルの伝達に関与する蛋白性因子をコードする遺伝子の活性を抑制するアンチセンス遺伝子なども挙げられる。さらに、インスリン作用を抑制するアンチセンス・インスリンレセプター遺伝子や、異常インスリンレセプターをコードする遺伝子なども挙げられる。アンチセンス、グルコキナーゼ遺伝子は内在性グルコキナーゼ遺伝子の作るRNAに相補的なアンチセンスRNAを発現するような遺伝子をいい、グルコキナーゼcDNA或いはその断片をプロモーターの下流に逆向きに組み込むことでその目的は達成される。グルコキナーゼcDNAとしてはマウス、ラット、モルモット、ヒト等から得られるcDNAライブラリーから分離されたものや、PCR法で増幅して得られたものや、合成あるいは半合成のものが用いられ、例えばマウスβ細胞由来グルコキナーゼcDNAがその例として挙げられる。該cDNA断片は、グルコキナーゼの一部に相補的なRNAを発現し、その活性を減少させ得る長さであればどの部分の断片であってもよい。

【0007】本発明の遺伝子産物が血糖上昇に関与する遺伝子は、必要な調節配列、プロモーター、エンハンサーを備えていることが必要で、遺伝子を転写し、その結果RNAが産生されるものを指す。これら遺伝子のプロモーター、エンハンサーとしてはグルコキナーゼ遺伝子が本来もつプロモーター、エンハンサーでもよいし、通常は別の遺伝子の発現を操作する異種プロモーター、異種エンハンサーを用いることもできる。これらの具体例としてはインスリンプロモーター／エンハンサー、アミリンプロモーター／エンハンサー、β-アクトチンプロモーター／エンハンサーなどが挙げられる。内在性遺伝子の発現している組織または細胞、例えば膵島β細胞内で、同所的に働くプロモーター、あるいは必要に応じてさらにエンハンサーを有することが好ましく、インスリンプロモーターがその例としてあげられる。

【0008】本発明の遺伝子を導入する哺乳動物としてはマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギ等が挙げられるが、その育成、取扱い上の容易性、経済性、効率等からマウスが好ましく用いられる。遺伝子の導入法としては、電気穿孔法、リボソーム法、リン酸カルシウム法等が利用できるが、受精卵へのDNAのマイクロインジェクション法等による物理的注入が好ましい。DNA注入細胞は仮親の卵管に移植し、個体まで発生した動物の尾部先端を切断し、体細胞中のDNAを抽出してサザンブロット分析により導入遺伝子の存在を確認する。目的遺伝子の組込が確認された個体は交配によって該遺伝子を子孫に伝えることができる。これらの哺乳動物の随時血糖値は正常値160～200mg/dlに比して200mg/dl以上高値を示すものが有効とみなされる。

そのうち、30～100mg/dlの範囲で上昇したものが好ましい。

【0009】本発明明細書および図面において、塩基を略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。

DNA : デオキシリボ核酸

cDNA : 相補的デオキシリボ核酸

A : アデニン

T : チミン

G : グアニン

C : シトシン

RNA : リボ核酸

mRNA : メッセンジャーリボ核酸

なお、本発明のアンチセンス・グルコキナーゼ遺伝子においては、それによって得られるアンチセンスRNAが内在性グルコキナーゼ遺伝子により作られるRNAと会合し得る範囲内で塩基配列の一部が修飾（付加、除去、その他の塩基への置換など）されていてもよい。

【0010】

【実施例】以下の実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。後述の実施例で得られた形質転換体エシェリキア・コリ (*Escherichia coli*) HB101 IGA-3 株は平成5年3月25日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (FRI) に受託番号FERM P-13553として寄託されている。

実施例1 導入遺伝子の調製

約1.9kbのBamHI-NcoI・ヒトインスリンプロモーター (Sarvetnick et al., セル (Cell), 52巻, 773頁, 1988年)の末端をリンカーを用いて、各々SphI, BamHIとしたものをcDNA発現用ベクターpKCR3 (Landais et al., ジャーナル・オブ・イムノロジー (J. Immunol.) 137巻, 3002頁, 1986年)のSphI-BamHI領域と置き換えた。マウスグルコキナーゼcDNA断片は、マウスβ細胞株MIN6 (Miyazaki et al., エンドクリノロジー (Endocrinology) 127巻, 126頁, 1990年)から作製したcDNAライブラリーからPCR法 (Polymerase Chain Reaction) で第405塩基から第687塩基までの283bpを増幅して得られた。用いたオリゴヌクレオチドプライマーは、その中にEcoRI 認識配列を形成するように修飾した以下のものを用いた。

5' TGGGCGAATTCTACTTGA3', 5' TCTGAGAATTCTGGGGTGA3'

得られたPCR産物をEcoRI で消化後、上述の発現ベクターのインスリンプロモーター下流のウサギβグロビン遺伝子配列のEcoRI サイトに逆向きに導入した。なお、組み込まれたグルコキナーゼcDNAの塩基配列は既に発表されているものと一致していた [Hughes et al.,

ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) 266巻, 4521頁, 1991年]。この配列には、翻訳開始のATG配列が含まれる。該プラスミドを大腸菌 (*E. coli*) HB101株に導入して、形質転換体E. coli HB101 IGA-3 (FERM P-13553)を得た。マウスの受精卵に導入するアンチセンス・グルコキナーゼ遺伝子には、このプラスミドをSphI とXhoI で切り出した約3.3kbの直鎖状DNA断片を用いた。この導入遺伝子 (トランスジーン) は、図1に示すように、ヒトインスリンプロモーターの3' 10 端にウサギβグロビン遺伝子の第2エクソン・イントロン、第3エクソンの一部を含むBamHI-EcoRI 断片 (640bp)、マウスβ細胞由来グルコキナーゼcDNAの5'側約270塩基対 (逆向き)、ウサギβグロビン遺伝子のポリAシグナルを含むEcoRI-BglII 断片 (523bp) を結合したものである。

【0011】実施例2: 遺伝子導入動物の作製

実施例1で得たアンチセンス・グルコキナーゼ遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを以下のようにして作製した。交尾翌日の受精卵を雌マウスの卵管より採取し、細いガラスピペットを用いて上記DNA溶液 (5μg/ml)を受精卵の雄性前核に注入した。これらの受精卵を偽妊娠雌マウスの卵管に15～30個移植し、約20日後に自然分娩または帝王切開により出生させた。生まれた40匹のマウスを飼育し、4週齢で尾部の一部からDNAを抽出し、サザンブロット法により、導入遺伝子DNAの存在を検索した。その結果、14匹がトランスジェニックマウスであることが確認された。

【0012】実施例3: トランスジェニックマウスの血糖値の解析

これら初代トランスジェニックマウスを飼育し、5週齢以後、1週おきに随時血糖を尾部から採血して、血糖測定器 (アントセンス: マイルス三共) を用いて測定した。その結果、導入DNAのコピー数の多いマウスでは、導入遺伝子をもたないマウスに比べ、有意に血糖が高いことが示された。高い血糖値を示したトランスジェニックマウスのうち、2系統 (#15と#38) を繁殖させて、第2世代 (F1) マウスを得た。このうち、雄のトランスジェニックマウス (● (9匹), ■ (5匹))、トランスジーンをもたないコントロール雄マウス (○ (9匹), □ (5匹)) の血糖値を調べた。その結果、餌を与えたとき、2時間あるいは4時間餌を与えないでおいたときの各々で、トランスジェニックマウスの方が20～30 mg/dl, 30～50 mg/dl, 60 mg/dl高い血糖値を示した (図2)。この結果は、アンチセンス・グルコキナーゼ遺伝子導入トランスジェニックマウスは遺伝的に血糖が高くセットされていることを示している。

【0013】

【発明の効果】本発明により、血糖上昇に関与する遺伝子を分化全能性を有する細胞に導入して遺伝子導入哺乳

7

動物が作製され、特にアンチセンス・グルコキナーゼ遺伝子を染色体に安定に取り込み、遺伝的に高血糖あるいは糖尿病を呈する疾患モデル動物が提供される。この糖尿病発症モデルマウスは、日本のインスリン非依存型糖尿病患者の大多数と同様のインスリン初期分泌障害特性を有すると考えられる点でも、きわめて優れた疾患モデル動物である。したがって、このマウスは、血糖値維持機構の解析や抗糖尿病薬の開発に有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 トランスジェニックマウス作製に用いたアンチ

8

センス・グルコキナーゼ遺伝子の構造を示す。

【図2】 アンチセンス・グルコキナーゼ遺伝子を導入した2系統(#15と#38)のトランスジェニックマウスの第2世代(F1)の雄のトランスジェニックマウス(TG)、トランスジーンをもたないコントロール雄マウス(LM)の血糖を調べたものである。餌を与えたとき、2時間あるいは4時間餌を与えないでおいたときの各々で、血糖をアントセンス(マイルス三共)を用いて測定した。

【図1】



【図2】

